

Studies on Purification and Some Properties of Fibrin Stabilizing Factor. (フィブリン安定化因子の精製とその性質に関する研究)

著者	高木 尚
号	267
発行年	1971
URL	http://hdl.handle.net/10097/23553

氏名・（本籍）	たかぎ 高 木 尚 （群馬県）
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 2 6 7 号
学位授与年月日	昭和 4 6 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専門課程	東北大学大学院理学研究科 （博士課程）生物学専攻修了
学位論文題目	Studies on Purification and Some Properties of Fibrin Stabilizing Factor （フィブリン安定化因子の精製とその性質に 関する研究）
論文審査委員	（主査） 教授 青 木 廉 教授 樋 渡 宏 一 助教授 小 西 和 彦

論 文 目 次

緒	論
材料及び方法	
結	果
考	察
ま	と め
文	献
図	と 表
参	考 論 文

論 文 内 容 要 旨

緒 論

フィブリン安定化因子 (略して FSF と呼ぶ) は, 1944 年 Robbins により発見されたが, その後, この分野の研究は, 1961 年 Loewy らが かなりの高純度に精製し, 1962 年 Lorand らが trans-peptidase としてフィブリンに作用する, 即ち, フィブリン分子間に, 共有結合を形成する酵素であると提唱するまでは, ほとんど進まなかったと言えよう。それ以後, FSF の研究は, 急速に進歩した。

1966 年, Fuller と Doolittle は, FSF は, フィブリン分子の lysine 残基の側鎖と glutamine 残基の側鎖の間に, ϵ (r-glutamyl) - lysine のイソペプチド結合を形成する, transglutaminase として作用することを明かにした。このイソペプチド結合は, 物理化学の面から, 蛋白質中に形成可能であると言われていたが, 実際, その存在の証明はなかった。1968 年, Pisano らは, FSF の作用により, フィブリン中に 確かにこのイソペプチド結合が, 形成されることを見出し, その数は, フィブリン 1 分子当り, およそ 2 モルであることを証明した。

1970 年, Takagi と Iwanaga は, このイソペプチド結合は, フィブリン分子の r 鎖と r 鎖の間に出来ることを見出した。一方, Chen と Doolittle は, フィブリンの r 鎖の内, $\frac{2}{3}$ が r 鎖同志で結びつき, 残りの $\frac{1}{3}$ の r 鎖は α 鎖と結びついていると提唱した。他に Lorand らは, r 鎖と α 鎖の結合が主であるとし, 又, McKee らは, r 鎖同志以外に, α 鎖のポリマーが出来る主張している。しかし 1971 年, Takagi と Iwanaga は, 更に種々の方法を用いて, このイソペプチド結合は, r 鎖間のみ出来ることを明かにした。 r 鎖間の結合については, 1970 年, Chen と Doolittle は, r 鎖の C 末端より, 3 番目の lysine と 8 番目の glutamine との間に出来, 従って r 鎖は互に逆平行に並んでいることを明かにした。

この様に, FSF の反応機構については, ほぼ, 明かになったが, FSF 自体の構造, 性質, 活性化の機構等については, ほとんど解っていない。FSF の活性化の機構については, 1964 年, Konishi と Lorand により Ca^{++} の存在下で, thrombin によって活性化されることが明らかにされ, 更に, 1967 年, Konishi と Takagi により, trypsin によっても活性化されることから, FSF の活性化の際には, 一次構造的変化を伴うことが明らかにされたが, これ以上の活性化機構, 構造, 性質を研究するには, 従来の精製法では不充分で, より高純度に精製しなければならない。更に, 量的にも, かなりの量が得られることが必要である。

本論文は, FSF を高純度に精製し, 量的にも充分得られる方法を確立し, 更に, 精製した標品を用いて, FSF の性質, 構造について明かになったことをまとめたものである。

方法, 及び結果

粗 FSF は, 牛血漿より, Loewy らの方法で調製した。50mM tris buffer, pH 7.5 に対し透析後, 同液で緩衝化してある DEAE - cellulose カラムにて, NaCl 濃度を 0 から 0.3M まで直線的に変えて溶出した。FSF 活性のある分画を集め, 硫酸分画後 Sepharose 6 B カラムで溶出した。蛋白

質は、大きく2つの画分に溶出され、FSFは、その内、先の画分、即ち分子量の大きい部分に溶出された。更に、Sephacrose 6Bカラムで、上の活性部分を再クロマトグラフィーを行うと、単一のピークが得られ、又、活性も、蛋白質の吸収と平行になり、比活性は、ほとんど一定となった。

この様なことから、FSFは、ほぼ完全に精製され、他の蛋白質の混在は、ないものと考えられる。この様にして得られた標品をディスク電気泳動で調べてみると、単一でわずかに、混在が検出され得るが、構造研究上、さしつかえない程度のものである。

この方法によると、粗FSFからおおよそ25倍精製され、活性収量は、おおよそ54%であった。又、脱塩後、凍結乾燥して得られたFSFは、牛血漿10ℓより、おおよそ50mgであった。

この様にして得たFSF標品を用いて以下の検討を行なった。

精製したFSFは、通常の蛋白質の吸収を示し、0.2N. NaOHを含む8M尿素中での $E_{280}^{1\%}$ は14.15と計算された。FSFの分子量は、Sephadex G-200カラムを用いAndrewsの方法で求めた。それによるとおおよそ 3×10^5 という結果を得た。

アミノ酸分析の結果からは、多くの蛋白質と同様Asp, Gluが多くみられ、His, Metが一番少なかった。それ以外は、 10^5 g蛋白質当り、おおよそ50モル前後であった。Half-cystineは21.2モルであった。このHalf-cystineについては、メルカプトエタノールで還元した標品、及び還元しない標品で、5Mグアニジン塩酸中で、PCMB滴定、及びDTNBによる比色法で、SH基として測定したが、いずれにおいても、 10^5 g蛋白質当り、3~4モルしか、検出来なかった。このことは、FSFの一部に、S-S結合が極在しているのではないかと考えられる。

アミノ末端分析は、PITC法で行なったが、その結果、FSF 3×10^5 g当り、おおよそ2モルのSerとおおよそ2モルのHisが検出された。

このことから、FSFは、少なくとも4本のペプチド鎖からなっているものと考えられる。

FSFの様に大きな分子量を持つ蛋白質は、多くの場合、いくつかのSubunitからなっていることが知られている。FSFについて、その様な目的で、SDS存在下で、ディスク電気泳動を行なった。その結果、FSFは、2つのSubunit (F_1, F_2)に分れた。各々の分子量を求めてみると F_1 はおおよそ 10^5 、 F_2 はおおよそ77,000であった。この場合、メルカプトエタノールを加えても、分子量は小さくならなかった。

アミノ末端分析の結果とSDS存在下でのディスク電気泳動の結果から、FSFは、4つのSubunit即ち、 F_1 と F_2 のdimer、からなっており、各々は、非共有結合でもって会合していると考えられる。

結 論

FSFの精製は、イオン交換セルロース及び分子篩カラムクロマトグラフィーで行なった。その結果、ディスク電気泳動で、ほぼ単一の標品を得ることが出来た。この方法は、従来、2, 3の研究室で報告されている精製法より、非常に再現性があり、又、簡単に大量の精製された標品を常に得ることが出来る。

この様にして得た FSF を用いて FSF の構造及び性質について検討を行なった。

FSF の分子量は Andrews の方法で、およそ 3×10^5 と推定された。アミノ末端分析の結果、FSF 3×10^5 g 当りおよそ 2 モルの Ser とおよそ 2 モルの His が検出された。更に、SDS 存在下でディスク電気泳動を行なった結果、FSF は 2 つの Subunit (F_1 , F_2) に分れ、各々の分子量は、 F_1 は 10^5 , F_2 は 77,000 と推定された。又、この操作中にメルカプトエタノールを加えても、これらの Subunit の分子量は、更に小さくならなかった。

以上の様に、アミノ末端分析、及び SDS 存在下でのディスク電気泳動の結果から FSF は 4 つの Subunit、即ち F_1 と F_2 の dimer からなり、各々の Subunit は、非共有結合で会合しているものと考えられる。

論文審査結果の要旨

クイブリン安定化因子は、血液凝固の最終過程に作用するものであるが、本因子はトロンビン活性化されて後フィブリンに作用し、フィブリンの r 鎖間に r -glutamyl- ϵ -lysine のイソペプチド結合を形成することが最近明らかにされた。これは血液凝固という生理作用における重要な発見だけでなく、蛋白質化学及び酵素学の立場から見ても画期的な問題である。しかし、この因子の蛋白質としての諸性質及びトロンビンによる活性化機構については、ほとんど明らかにされていない。これはフィブリン安定化因子の精製の困難さに原因がある。

本論文の研究では、イオン交換体及び分子篩をたくみに使用することにより、比較的簡便にしかも高い収量で本因子を精製することに成功した。純度はディスク電気泳動法で単一と認められた。また分子量は約 300,000 であり、アミノ酸組成は Asp, Glu が多く His, Met が少く、それ以外のアミノ酸は 10^5 g 蛋白質あたりおよそ 50 モル前後であった。アミノ末端基は、 3×10^5 g 蛋白質あたりおよそ 2 モルの Ser と His が検出された。このことからフィブリン安定化因子は少くも 4 本のポリペプチド鎖からなっていると考えられる。次に SDS 存在下のディスク電気泳動法で、この因子は 2 つの Subunit にわかれ分子量はそれぞれ 100,000 及び 70,000 であった。メルカプトエタノール存在下でも、これらの分子量に変化はなかった。以上のことからフィブリン安定化因子は Ser 及び His を N-末端とする Subunit それぞれの二量体からなる四量体であり、それぞれの Subunit は非共有結合で会合していると推論された。

本研究は、従来この因子の研究の障害となっていた高純度のものを比較的少量に得るという精製法に成功し、今後の本因子の研究を容易にした点で高く評価され、また、分子量、アミノ酸組成、アミノ末端などを明らかにした研究では、アミノ酸組成及びアミノ末端は本研究ではじめて明らかにされたものである。

また、本因子の Subunit についても重要な推論をなしうる結果を得た点についても高く評価される。以上の点から本論文は博士の学位論文として適当である。

よって、高木尚提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。